

結合組織成長因子(CTGF)の強皮症病変形成への関与

著者	竹原 和彦
著者別表示	Takehara Kazuhiko
雑誌名	平成11(1999)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1998-1999
ページ	15p.
発行年	2000-03
URL	http://doi.org/10.24517/00050699



結合組織成長因子(CTGF)の強皮症病変形成への関与

(課題番号10670785)

平成10年度～平成11年度科学研究補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

金沢大学附属図書館



8000-89045-3

平成12年3月

研究代表者 竹原 和彦

(金沢大学医学部教授)

結合組織成長因子(CTGF)の強皮症病変形成への関与

(課題番号10670785)

平成10年度～平成11年度科学研究補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 竹原 和彦
(金沢大学医学部教授)

著 者 寄 附

研究組織

研究代表者：竹原 和彦（金沢大学医学部教授）

研究分担者：川原 繁（金沢大学医学部附属病院講師）

佐藤 伸一（金沢大学医学部附属病院講師）

研究経費

平成10年度	2,000千円
平成11年度	1,200千円
合 計	3,200千円

研究発表

(1)学会誌等

- 1) Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T., and Takehara, K. : Role and interaction of CTGF with TGF- β in persistent fibrosis : A mouse fibrosis model. J. Cell. Physiol., 181 : 153-159, 1999

(2)学会発表

- 1) Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., and Takehara, K. : Role and interaction of CTGF with TGF- β in persistent fibrosis : A mouse fibrosis model. American College of Rheumatology 63rd Scientific meeting, Nov. 13-17, 1999
- 2) 森 俊典, 永岡徹也, 信崎幹夫, 佐藤伸一, 柿沼 馨, 林 伸和, 竹原和彦 : マウス線維化モデルとCTGF。第27回日本臨床免疫学会, 1999年8月。

(3)出版物

なし

はじめに

全身性強皮症は結合組織疾患のひとつで、レイノー症状や強指症（手指の腫脹・硬化）を生じ、種々の特異抗体が陽性を示す。そして皮膚や肺、心、腎、消化管などに広範な線維化をきたすことによりさまざまな障害が引き起こされる。その原因は不明だが、皮膚硬化病変部由来の線維芽細胞による細胞外基質の合成が亢進していることから、線維芽細胞を刺激するサイトカインであるTGF- β (transforming growth factor-beta) の異常な産生ないし活性化が関与していると考えられている。

TGF- β は主に血小板やマクロファージから放出されて多彩な生理学的活性を示すサイトカインであるが、強皮症の発症において果たすと考えられる役割については、今までに種々の報告がなされている。TGF- β はin vitroで線維芽細胞を刺激して細胞外基質の産生を亢進すること¹⁾²⁾、in vivoで創傷治癒を促進すること³⁾⁴⁾⁵⁾、また静脈内投与や腹腔内投与、in vivo transfectionによって実験的に臓器の線維化を引き起こすこと⁶⁾⁷⁾⁸⁾が知られている。

CTGF (connective tissue growth factor) はヒト臍帯静脈内皮細胞の培養上清中に抗platelet-derived growth factor (PDGF) 抗体によって検出された。TGF- β 刺激によって選択的に線維芽細胞から分泌され⁹⁾、線維芽細胞の増殖と細胞外基質産生を亢進する¹⁰⁾ことから、TGF- β の作用をその下流で仲介する因子 (downstream mediator) とも考えられている。

CTGFも、TGF- β と同様に、種々の線維化疾患の発症に関与することが示唆されてきた。これまでにわれわれは、強皮症の皮膚硬化病変部には組織学的な硬化と関連したCTGF mRNAの発現がみられること¹¹⁾や、強皮症患者の血清CTGF濃度が疾患の重症度に相関して上昇していること¹²⁾を報告した。また腎硬化症や肺線維症においても病変部にCTGF mRNAが発現していることが示されている。

これらのサイトカインを新生児マウスに皮下投与して組織変化を誘導する試みがなされている。それによると、TGF- β の連日投与により3日後に肉芽組織が誘導されること¹³⁾、しかし連日投与を継続してもこの変化は7日後に消失すること¹⁴⁾、またCTGFの皮下投与でも同様の肉芽組織が誘導されること¹⁰⁾が報告されている。

われわれは、これらの報告に基づき、2つのサイトカインを組み合わせ

て同時に、もしくは連続して皮下投与することによりマウスに生ずる組織変化を観察し、さらに単独投与の場合と比較して、この実験系におけるサイトカインの相互作用について検討した。以下にその方法と結果について述べる。

材料および方法

予備実験¹⁴⁾によりあらかじめ至適用量を決定した上で、TGF- β 、CTGF、basic fibroblast growth factor (bFGF) をPBSに溶解して最終濃度が各々40, 20, 50ng/ μ lになるように調整し、単独あるいは種々の組み合わせで新生児BALB/cマウスの項背部に連日20 μ l、すなわちTGF- β 800ng, CTGF400ng, bFGF1000ngを皮下投与した。TGF- β はアイソタイプによる組織変化に差がないことを確認した上で、主にTGF- β 3を用いた。最終投与から24時間以内に組織を採取して、Hematoxylin-Eosin染色により組織変化を観察した。さらにCTGFのRNA probeを用いたin situ hybridizationにより線維芽細胞におけるCTGF mRNAの発現を検討した。

表1に投与日程を示す。1つのサイトカインの単独投与、2つのサイトカインの同時投与、1つのサイトカインを3日間投与した後引き続き別のサイトカインを投与する連続投与を行い、PBSをコントロールとした。

成 績

TGF- β の単独投与によって4日目にリンパ球、組織球、線維芽細胞と浮腫、新生血管からなる肉芽組織が誘導されたが、引き続き投与を継続してもこの変化は8日目に消失した(図1)。CTGFの単独投与では4日目に肉芽組織が誘導されたが、その変化はTGF- β の単独投与と比較して明らかに軽度であった。そしてTGF- β の単独投与と同様に、引き続き投与を継続してもこの変化は8日目に消失した(図2)。

これに対して、TGF- β とCTGFを同時投与すると線維芽細胞の集簇と細胞外基質の沈着による線維化組織が形成され、8日目以降投与を中止してもこの変化は11日目まで維持された(図3)。またTGF- β を3日間投与した後引き続きCTGFを4日間投与する連続投与でも、同時投与と同様に8日目に線維化組織が形成され、8日目以降投与を中止してもこの変化は11日目ま

で維持された。しかし、連続投与の順序を逆にして、CTGFに引き続きTGF- β を投与すると組織変化は減弱ないし消失した。

遊走した細胞の密度と基質沈着の程度により組織変化を半定量的に評価して、結果を表2にまとめた。単独投与では4日目に一過性に出現して8日目に消失する組織変化が、TGF- β とCTGFもしくはTGF- β とbFGFを組み合わせ投与することによって11日目まで維持されるという結果が得られた。

次にin situ hybridizationの結果を表3に示す。CTGFmRNAは、TGF- β ないしCTGF単独投与により4日目に誘導された肉芽組織に一過性に発現し、肉芽組織の消失と時期を同じくして、8日目に減弱・消失した。また同時投与や連続投与によって形成された線維化組織にはCTGFmRNAの発現はみられなかった。

考 察

以上の実験結果は、(1) TGF- β 、CTGF、bFGFの単独投与により一過性に肉芽組織が誘導される、(2) TGF- β とCTGF、もしくはTGF- β とbFGFの同時投与により、持続的な線維化組織が形成される、(3) TGF- β に引き続きCTGFを、もしくはTGF- β に引き続きbFGFを連続投与すると、同時投与と同様に線維化組織が形成される、(4) CTGFmRNAは、TGF- β もしくはCTGFの単独投与4日目に一過性に発現する、(5) TGF- β とCTGFを組み合わせ投与することによって形成された線維化組織にはCTGFmRNAの発現はみられない、とまとめられる。

得られた結果から、線維化の形成におけるCTGFの役割について考察した。まずこの実験系においては、CTGFの単独投与による組織変化はTGF- β の単独投与と比較して明らかに軽度であったことから、CTGFが肉芽組織を誘導する作用は少ないものと思われた。そしてCTGFは、TGF- β の単なるdownstream mediatorではなくて、TGF- β との相互作用によって線維化組織の形成に関与することが示唆された。さらに、連続投与においてTGF- β 投与後に引き続きCTGFを投与すると線維化組織が形成されたが、連続投与の順序を逆にしてCTGFを投与した後TGF- β を投与しても線維化組織は形成されなかったことから、CTGFはTGF- β に引き続き作用することによって線維化組織を維持すると考えられた。

まとめ

この実験系によって、線維化組織の形成のためにはTGF- β による誘導に引き続いてCTGFが持続的に作用して組織変化を維持する2段階の経過が必要であること、そして強皮症の発症においても同様に、TGF- β とCTGFの相互作用が生じている可能性が示唆された(図4)。

今後の課題

CTGF RNA probeを用いたin situ hybridizationの結果によれば、TGF- β もしくはCTGFにより内因性のCTGF産生が誘導されと考えられる。それでは、われわれの実験系でみられたCTGFmRNAの発現は、なぜ一過性なのであろうか。そして、強皮症の皮膚硬化病変部には組織学的な硬化と関連したCTGFmRNAの発現がみられるのに、TGF- β とCTGFの連続ないし同時投与により形成された線維化組織には、なぜCTGFmRNAの発現がみられないのか。今回得られたCTGFmRNA発現の結果については、なお疑問が残された。

TGF- β とCTGFが同一の線維芽細胞に作用するかどうか、CTGFがTGF- β 産生にどのような効果を及ぼすか、などについても、今回の結果からは答えることが出来なかった。今後、CTGF受容体が同定され、その発現を免疫染色やin situ hybridizationによって検討できれば、これらの疑問も明らかにされると思われる。

今回われわれが用いたTGF- β およびCTGF投与によるマウス線維化モデルによって、強皮症治療薬のスクリーニングがなされ、臨床応用につながることを期待される。

文 献

1) Raghow, R., Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., et al.: TGF- β increases steady state levels of typeI procollagen & fibronectin mRNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. J.Clin.Invest., 79:1285, 1987.

2) Varga, J., Rosenbloom, J. & Jimenez, S.A.: TGF- β causes a persistent increase in steady-state amounts of typeI & typeIII collagen & fibronectin

mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem.J.*, 247 : 597, 1987.

3) Beck, L.S., Chen, T.L., Hirabayashi, S.E., et al.: Accelerated healing of ulcer wounds in the rabbit ear by recombinant human TGF- β 1. *Growth factors*, 2:273, 1990.

4) Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Thomason, A., et al.: Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by TGF- β . *Science*, 237:1333, 1987.

5) Quaglino, D., Nanny, L.B., Ditesheim, J.A., et al.: TGF- β stimulates wound healing & modulates extracellular matrix gene expression in pig skin: Incisional wound model. *J.Invest.Dermatol.*, 97:34, 1991.

6) Isaka, Y., Fujiwara, Y., Ueda, N., et al.: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of TGF- β or PDGF gene into the rat kidney. *J.Clin.Invest.*, 92:2597, 1993.

7) Terrell, T.G., Working, P.K., Chow, C.P., et al.: Pathology of recombinant human TGF- β 1 in rats & rabbits. *Int.Rev.Exp.Pathol.*, 34B:43, 1993.

8) Zugmaier, G., Paik, S., Wilding, G., et al.: TGF- β 1 induces cachexia & systemic fibrosis without an antitumor effect in nude mice. *Cancer Res.*, 51:3590, 1991.

9) Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D.M., et al.: Regulation of CTGF gene expression in human skin fibroblasts & during wound repair. *Mol.Biol.Cell.*, 4:637, 1993.

10) Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., et al.: Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, & granulation tissue formation by CTGF. *J.Invest.Dermatol.*, 107:404, 1996.

11) Igarashi, A., Nashiro, K., Kikuchi, K., et al.: Significant correlation between CTGF gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J.Invest.Dermatol.*, 105:280, 1995.

12) Sato, S., Nagaoka, T., Hasegawa, M., et al.: Serum levels of CTGF are elevated in patients with systemic sclerosis: Association with the extent of skin sclerosis and the severity of pulmonary fibrosis. *J.Rheumatol.*, 27:149, 2000.

13) Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., et al.: TGF- β :Rapid induction of fibrosis & angiogenesis in vivo & stimulation of collagen formation in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83:4167, 1986.

14) Shinozaki, M., Kawara, S., Hayashi, N., et al.: Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by TGF- β – Simultaneous application with bFGF causes persistent fibrosis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 237:292, 1997.

表 1 投与日程

day1-3	day4-7	day8-10
单独投与		
TGF- β	TGF- β	-
CTGF	CTGF	-
bFGF	bFGF	-
PBS	PBS	-
同時投与		
TGF- β +CTGF	TGF- β +CTGF	-
TGF- β +bFGF	TGF- β +bFGF	-
連続投与		
TGF- β	CTGF	-
TGF- β	bFGF	-
CTGF	TGF- β	-
CTGF	TGF- β	TGF- β
bFGF	TGF- β	-
bFGF	TGF- β	TGF- β
CTGF	bFGF	-
bFGF	CTGF	-

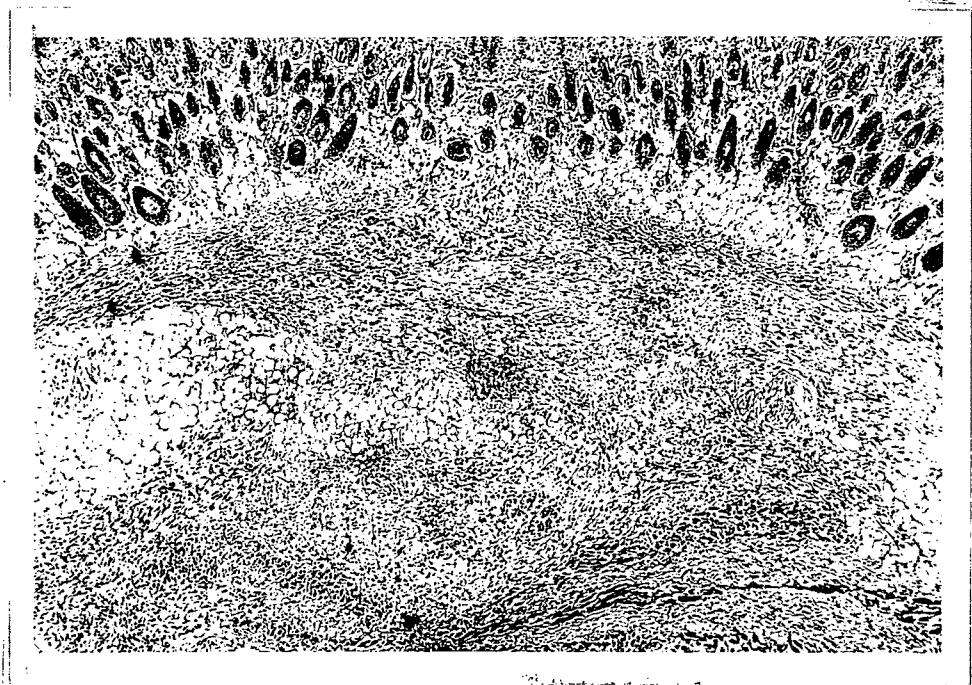


図1 TGF- β の単独投与により一過性に誘導された肉芽組織
上：4日目 下：8日目

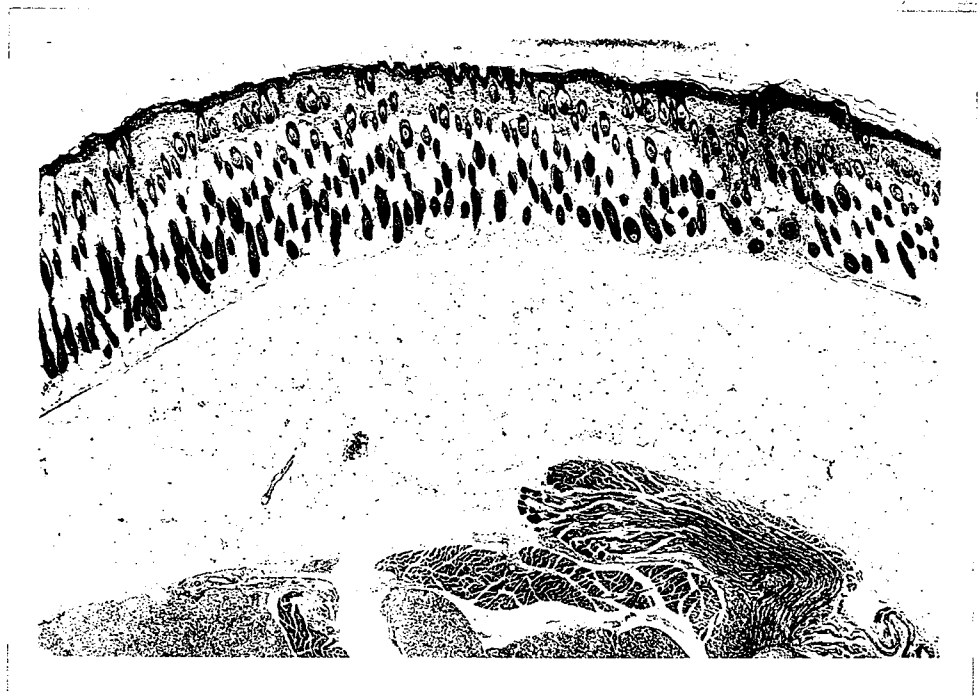


図 2 CTGF の単独投与により一過性に誘導された肉芽組織
上：4日目 下：8日目



図3 TGF- β とCTGFの同時投与により形成された線維化組織
上：8日目 下：11日目

表2 サイトカインの皮下投与による組織学的変化

投与日程			組織学的変化		
day1-3	day4-7	day8-10	day4	day8	day11
単独投与					
TGF- β	TGF- β	-	++	-	-
CTGF	CTGF	-	+-	-	-
bFGF	bFGF	-	+	+-	-
PBS	PBS	-	-	-	-
同時投与					
TGF- β +CTGF	TGF- β +CTGF	-	+++	+++	+++
TGF- β +bFGF	TGF- β +bFGF	-	+++	+++	+++
連続投与					
TGF- β	CTGF	-	++	+++	++
TGF- β	bFGF	-	++	+++	++
CTGF	TGF- β	-	+-	++	-
CTGF	TGF- β	TGF- β	+-	++	+
bFGF	TGF- β	-	+	++	-
bFGF	TGF- β	TGF- β	+	++	+
CTGF	bFGF	-	+-	+	-
bFGF	CTGF	-	+	-	-

表 3 サイトカインの皮下投与による CTGF mRNA 発現

投与日程		CTGF mRNA 発現	
day1-3	day4-7	day4	day8
単独投与			
TGF- β	TGF- β	++	-
CTGF	CTGF	+	+-
PBS	PBS	-	-
同時投与			
TGF- β +CTGF	TGF- β +CTGF	-	-
連続投与			
TGF- β	CTGF	++	-

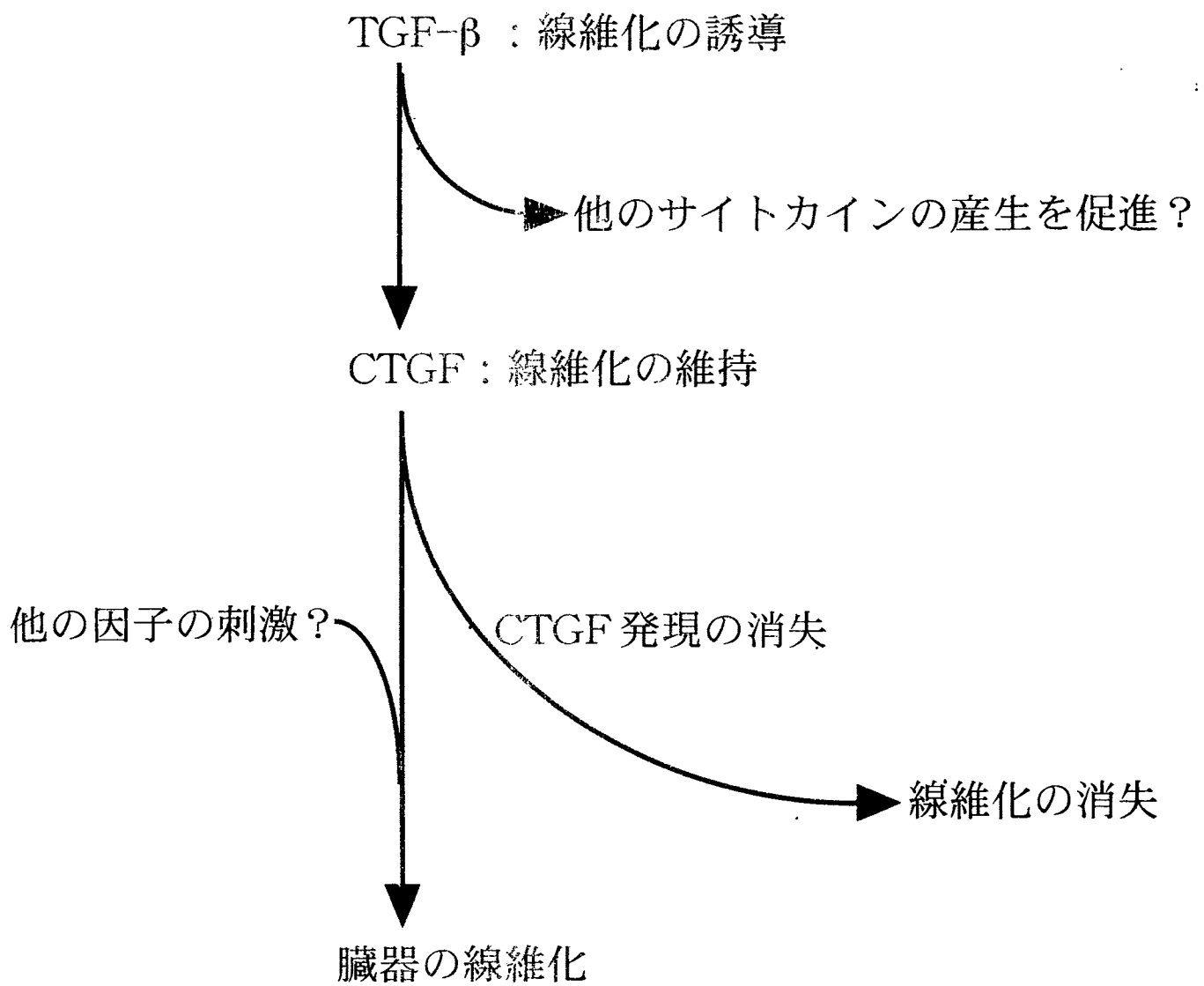


図 4 強皮症の発症機序 (仮説)